

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

**Application No. :**

**U.S. National Serial No. :**

**PCT International Application No. : PCT/JP00/02703**

**VERIFICATION OF A TRANSLATION**

**I, the undersigned translator, hereby declare that :**

**My name and post office address are as stated below;**

**That I am knowledgeable in Japanese language in which the below identified international application was filed, and that I believe the English translation of the international application No. PCT/JP00/02703 is a true and complete translation of the above identified international application.**

**I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.**

**Dated this 17th day of October, 2001, at Tokyo, Japan**

**Full name of the translator :**



**Gen OGAWA**

**Post Office Address :**

**SANWA INTERNATIONAL PATENT OFFICE,  
Syuwa No. 2 Toranomon Bldg.,  
21-19, Toranomon 1-chome, Minato-ku, Tokyo,  
105-0001 JAPAN**



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SATO, Masatoshi  
Sanwa International Patent Office  
Shuwa daini Toranomon Building  
21-19, Toranomon 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 105-0001  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 15 May 2000 (15.05.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference OP-1941-PCT	International application No. PCT/JP00/02703

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (for all designated States except US)  
KUDO, Satoshi et al (for US)

International filing date : 25 April 2000 (25.04.00)  
Priority date(s) claimed : 27 April 1999 (27.04.99)  
Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 05 May 2000 (05.05.00)  
List of designated Offices :

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE  
National : AU,BR,CA,CN,JP,KR,US

## ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase  
☒ confirmation of precautionary designations  
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: Susumu Kubo Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

## PATENT COOPERATION TREATY



PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SATO, Masatoshi  
Sanwa International Patent Office  
Shuwa daini Toranomon Building  
21-19, Toranomon 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 105-0001  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 29 June 2000 (29.06.00)	
Applicant's or agent's file reference OP-1941-PCT	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
International application No. PCT/JP00/02703	International filing date (day/month/year) 25 April 2000 (25.04.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99)
Applicant KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
27 April 1999 (27.04.99)	11/120706	JP	26 June 2000 (26.06.00)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Zakaria EL KHODARY

Telephone No. (41-22) 338.83.38

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT



From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SATO, Masatoshi  
Sanwa International Patent Office  
Shuwa daini Toranomom Building  
21-19, Toranomom 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 105-0001  
JAPON

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 02 November 2000 (02.11.00)		
Applicant's or agent's file reference OP-1941-PCT		<b>IMPORTANT NOTICE</b>
International application No. PCT/JP00/02703	International filing date (day/month/year) 25 April 2000 (25.04.00)	
		Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99)
Applicant KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

BR,CA,CN,EP,JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on

02 November 2000 (02.11.00) under No. WO 00/64854

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer  J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SATO, Masatoshi  
Sanwa International Patent Office  
Shuwa daini Toranomon Building  
21-19, Toranomon 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 105-0001  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 05 January 2001 (05.01.01)		
Applicant's or agent's file reference OP-1941-PCT		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP00/02703	International filing date (day/month/year) 25 April 2000 (25.04.00)	
Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99)		
Applicant KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
National : AU, CA, CN, JP, KR, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

National : BR

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  R. Forax  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL  
OF COPIES OF TRANSLATION  
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SATO, Masatoshi  
Sanwa International Patent Office  
Shuwa daini Toranomon Building  
21-19, Toranomon 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 105-0001  
JAPON

RECEIVED  
APR 08 2002  
TECH CENTER 1601/2900

Date of mailing (day/month/year) 30 August 2001 (30.08.01)	
Applicant's or agent's file reference OP-1941-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/02703	International filing date (day/month/year) 25 April 2000 (25.04.00)
Applicant KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA et al	

## 1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

## 2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AU,CA,CN,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

BR,JP,KR

## 3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Eliott PERETTI  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

6T  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference OP-1941-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/02703	International filing date (day/month/year) 25 April 2000 (25.04.00)	Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07C 69/587, A23D 9/00, A61K 31/201, 9/48, 9/20, A61P 3/04, 3/06, A23L 1/30		
Applicant KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 November 2000 (27.11.00)	Date of completion of this report 02 May 2001 (02.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02703

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/02703

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	2-8	YES
	Claims	1	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: Jose A. Arcos, "Rapid enzymatic production of acylglycerols from conjugated linoleic acid and glycerol in a solvent-free system", Biotechnology Letters, 1998, Vol. 20, No. 6, pp. 617-21

Document 2: JP, 10-508189, A (Wisconsin Alumni Research Foundation), 18 August 1998 (18.08.98)

Document 3: WO, 99/12538, A1 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 March 1999 (18.03.99)

Document 4: JP, 8-40981, A (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), 13 February 1996 (13.02.96)

#### Claim 1

The invention described in Claim 1 is not novel and does not involve an inventive step in the light of Document 1 cited in the international search report.

Document 1 discloses glycerides of conjugated fatty acids such as conjugated linoleic acid, which have a conjugated double bond in the molecule (abstract).

#### Claims 2-8

The inventions described in Claims 2-8 do not involve an inventive step in the light of Documents 2-4 cited in the international search report.

Documents 2 and 3 disclose the effectiveness of esters of conjugated linoleic acid for decreasing body fat, and Document 4 discloses glycerol esters of fatty acids having a body fat lowering action. Therefore, a person skilled in the art could easily conceive of forming an ester using glycerol as disclosed in Document 4 to give an ester of conjugated linoleic acid, which has a body fat decreasing action, i.e. a body fat lowering action, in an invention disclosed in Document 2 or 3, and attempting to use this ester for improving lipid metabolism.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02703

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
JP,2000-144170,A (Janiftec Inc.) [E,X]	26 May 2000 (26.05.2000)	31 August 1999 (31.08.1999)	01 September 1998 (01.09.1998)

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

佐藤 正年

殿

あて名

〒 105-0001

東京都港区虎ノ門1丁目21番19号  
秀和第2虎ノ門ビル  
三和国际特許事務所

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）  
〔PCT規則71.1〕

発送日  
（日.月.年）

22.05.01

出願人又は代理人  
の書類記号

OP-1941-PCT

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP00/02703

国際出願日

（日.月.年） 25.04.00

優先日

（日.月.年） 27.04.99

出願人（氏名又は名称）

株式会社ヤクルト本社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/J P）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4H

9450

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 28 MAY 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 OP-1941-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/02703	国際出願日 (日.月.年) 25.04.00	優先日 (日.月.年) 27.04.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C07C69/587, A23D9/00, A61K31/201, A61K9/48, A61K9/20, A61P3/04, A61P3/06, A23L1/30		
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヤクルト本社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☒ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.11.00	国際予備審査報告を作成した日 02.05.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 伊藤 幸司	4H 9450
電話番号 03-3581-1101 内線 3443		

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                          |            |         |        |                      |
|--------------------------|------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)という翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)という国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3という翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	2-8	有
	請求の範囲	1	無
進歩性(I S)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-8	無
産業上の利用可能性(I A)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: ARCOS, Jose A., "Rapid enzymatic production of acylglycerols from conjugated linoleic acid and glycerol in a solvent-free system," Biotechnology Letters, 1998, Vol. 20, No. 6, pages 617-621

文献2: JP, 10-508189, A (ウイスコンシン アラムナイリサーチ フォンデーション), 18.8月.1998 (18.08.98)

文献3: WO, 99/12538, A1 (大塚製薬株式会社) 18.3月.1999 (18.03.99)

文献4: JP, 8-40981, A (日本製薬株式会社) 13.2月.1996 (13.02.96)

## 請求の範囲1について

請求の範囲1に記載された発明は、国際調査報告書で引用された文献1から新規性及び進歩性を有しない。

文献1には、共役リノール酸等分子内に共役二重結合を有する共役脂肪酸グリセロイドが記載されている(ABSTRACT部分)。

## 請求の範囲2～8について

請求の範囲2～8に記載された発明は、国際調査報告書で引用された文献2～4から進歩性を有しない。

文献2～3には、体脂肪減少に共役リノール酸のエステルが有効である旨記載されている。一方、文献4には、脂質低下作用を有する脂肪酸のグリセロールとのエステルが記載されている。してみれば、文献2～3に記載された発明において、体脂肪減少、即ち脂質低下作用を有する共役リノール酸のエステルとして、文献4に記載のグリセロールを用いてエステル形成し、そのエステルを脂質代謝改善のために使用してみることは当業者が容易になし得ることである。



VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
JP, 2000-144170, A (株式会社ジャニフ・テック) [E, X]	26. 05. 00	31. 08. 99	01. 09. 98

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 OP-1941-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/02703	国際出願日 (日.月.年) 25.04.00	優先日 (日.月.年) 27.04.99
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヤクルト本社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。  
☒ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
 第 2 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。 ☐ なし  
☐ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## 第Ⅲ欄 要約 (第1ページの5の続き)

共役脂肪酸が元来有している生理効果を一層有効に発揮させ、共役脂肪酸が有する渋味や収斂味を抑制して、前記共役脂肪酸を経口摂取するに好適な共役脂肪酸の調整法の一つとして、共役二重結合を分子内に有する共役脂肪酸をグリセロールエステルの形態とした共役脂肪酸グリセリドを使用することを提案する。また、かかる共役グリセリドは（例：共役リノール酸を分子内に有するグリセリド）、脂質代謝改善効果、抗肥満効果、高脂血症予防・治療効果を有する。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C07C69/587, A23D9/00, A61K31/201, A61K9/48,  
A61K9/20, A61P3/04, A61P3/06, A23L1/30

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C07C69/587, A23D9/00, A61K31/201, A61K9/48,  
A61K9/20, A61P3/04, A61P3/06, A23L1/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	ARCOS, Jose A., "Rapid enzymatic production of acylglycerols from conjugated linoleic acid and glycerol in a solvent-free system," Biotechnology Letters, 1998, Vol. 20, No.6, pages 617-621, 特にpage 617(abstract)	1
Y	JP, 10-508189, A (ウイスコンシン アラムナイ リサーチ フォンデーション) 18. 8月. 1998 (18. 0 8. 98), 特に特許請求の範囲第11項, 第3頁第2行 & W O, 96/06605, A1 & US, 5554646, A	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 07. 00

国際調査報告の発送日

18.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤幸司



4H

9450

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 99/12538, A1 (大塚製薬株式会社) 18. 3 月. 1999 (18. 03. 99), 特に第2頁第5～8行, 第3 頁第25～28行 & JP, 11-79987, A	1-8
Y	JP, 8-40981, A (日水製薬株式会社) 13. 2月. 1 996 (13. 02. 96), 特に特許請求の範囲第1項, 第6頁 第9欄第43～47行 (ファミリーなし)	1-8
E, X	JP, 2000-144170, A (株式会社ジャニフ・テッ ク) 26. 5月. 2000 (26. 05. 00), 特に第5頁第7 欄第8行～同頁第8欄第3行 (ファミリーなし)	1-8
A	JP, 7-267898, A (日清製粉株式会社) 17. 10 月. 1995 (17. 10. 95) (ファミリーなし)	1-8

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 05 January 2001 (05.01.01)	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/02703	<b>Applicant's or agent's file reference</b> OP-1941-PCT
<b>International filing date (day/month/year)</b> 25 April 2000 (25.04.00)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 27 April 1999 (27.04.99)
<b>Applicant</b> KUDO, Satoshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 27 November 2000 (27.11.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b> R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年04月25日 (25. 04. 2000) 火曜日 10時15分32秒

OP-1941-PCT

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/R0/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 0-4-1 右記によって作成された。	PCT 25. 4. '00 受領印
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 08. 03. 2000)
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	OP-1941-PCT
I	発明の名称	共役脂肪酸エステル
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	株式会社ヤクルト本社
II-4en	Name	KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA
II-5ja	あて名:	105-8660 日本国 東京都 港区 東新橋1丁目1番19号
II-5en	Address:	1-19, Higashishinbashi 1-chome, minato-ku, Tokyo 105-8660 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	03-3574-8968
II-9	ファクシミリ番号	03-3574-7049

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年04月25日（25. 04. 2000）火曜日 10時15分32秒

OP-1941-PCT

III-1 III-1-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4ja III-1-4en III-1-5ja	氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:	工藤 聡 KUDO, Satoshi 105-8660 日本国 東京都 港区 東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
III-1-5en	Address:	c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashishinbashi 1-chome, minato-ku, Tokyo 105-8660 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja	氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:	水澤 直美 MIZUSAWA, Naomi 105-8660 日本国 東京都 港区 東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
III-2-5en	Address:	c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashishinbashi 1-chome, minato-ku, Tokyo 105-8660 Japan
III-2-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-2-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	
III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja	氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:	羽村 真帆子 HAMURA, Mahoko 105-8660 日本国 東京都 港区 東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内
III-3-5en	Address:	c/o Kabushiki Kaisha Yakult Honsha, 1-19, Higashishinbashi 1-chome, minato-ku, Tokyo 105-8660 Japan
III-3-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-3-7	住所 (国名)	日本国 JP



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年04月25日 (25. 04. 2000) 火曜日 10時15分32秒

OP-1941-PCT

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	佐藤 正年 SATO, Masatoshi 105-0001 日本国 東京都 港区 虎ノ門1丁目21番19号 秀和第2虎ノ門ビル 三和国際特許事務所 SANWA INTERNATIONAL PATENT OFFICE. Shuwa daini Toranomom Bldg. 21-19, Toranomom 1-chome, minato-ku, Tokyo 105-0001 Japan
IV-1-2en	Address:	
IV-1-3	電話番号	03-3504-3508
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3504-3507
IV-1-5	電子メール	BYR12607@nifty.ne.jp
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja IV-2-1en	氏名 Name(s)	佐藤 年哉 SATO, Toshiya
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AU BR CA CN JP KR US
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	先の出願日	1999年04月27日 (27. 04. 1999)
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-120706
VI-1-3	国名	日本国 JP

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年04月25日（25. 04. 2000）火曜日 10時15分32秒

OP-1941-PCT

VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の 番号のものについては、出願書 類の認証謄本を作成し国際事務 局へ送付することを、受理官庁 に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	5	-
VIII-2	明細書	23	-
VIII-3	請求の範囲	2	-
VIII-4	要約	1	op1941. txt
VIII-5	図面	1	-
VIII-7	合計	32	
VIII-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-9	手数料計算用紙	✓	-
VIII-16	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-17	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する 特許印紙を貼付した書 面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振 込を証明する書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の 番号	2	
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名 (姓名)	佐藤 正年	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名 (姓名)	佐藤 年哉	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書 類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書 類を補完する書類又は図面で あってその後期間内に提出さ れたものの実際の受理の日 (訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づ く必要な補完の期間内の受理 の日	
10-5	出願人により特定された国際 調査機関	ISA/JP

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

OP-1941-PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2000年04月25日（25. 04. 2000）火曜日 10時15分32秒

10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	
------	----------------------------------	--

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--



(51) 国際特許分類7 <b>C07C 69/587, A23D 9/00, A61K 31/201, 9/48, 9/20, A61P 3/04, 3/06, A23L 1/30</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO00/64854</b>  (43) 国際公開日 2000年11月2日(02.11.00)																				
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02703  (22) 国際出願日 2000年4月25日(25.04.00)  (30) 優先権データ 特願平11/120706      1999年4月27日(27.04.99)      JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ヤクルト本社 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA)[JP/JP] 〒105-8660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 工藤 聡(KUDO, Satoshi)[JP/JP] 水澤直美(MIZUSAWA, Naomi)[JP/JP] 羽村真帆子(HAMURA, Mahoko)[JP/JP] 〒105-8660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社 ヤクルト本社内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 佐藤正年, 外(SATO, Masatoshi et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目21番19号 秀和第2虎ノ門ビル 三和国际特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国    AU, BR, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書																				
(54)Title: <b>CONJUGATED FATTY ACID ESTERS</b>  (54)発明の名称    共役脂肪酸エステル  <div data-bbox="406 1339 1110 1705"> <table border="1"> <caption>Graph Data (Estimated)</caption> <thead> <tr> <th>Time (hr)</th> <th>Series 1 (mg/dl)</th> <th>Series 2 (mg/dl)</th> <th>Series 3 (mg/dl)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>100</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>370</td> <td>240</td> <td>140</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>320</td> <td>220</td> <td>120</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>140</td> <td>100</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table> </div> (57) Abstract Use of conjugated fatty acid glycerides, which are formed by converting conjugated fatty acids having conjugated double bond(s) in the molecule into glycerol esters, to more effectively exert the inherent physiological effects of the conjugated fatty acids and control the bitterness or astringency of the conjugated fatty acids, thereby making the conjugated fatty acids suitable for oral intake. These conjugated glycerides (for example, glycerides having conjugated linoleic acid in the molecule) have effects of improving lipid metabolism, preventing obesity, and preventing and treating hypertension.			Time (hr)	Series 1 (mg/dl)	Series 2 (mg/dl)	Series 3 (mg/dl)	0	100	100	100	2	370	240	140	4	320	220	120	6	140	100	80
Time (hr)	Series 1 (mg/dl)	Series 2 (mg/dl)	Series 3 (mg/dl)																			
0	100	100	100																			
2	370	240	140																			
4	320	220	120																			
6	140	100	80																			

共役脂肪酸が元来有している生理効果を一層有効に発揮させ、共役脂肪酸が有する渋味や収斂味を抑制して、前記共役脂肪酸を経口摂取するに好適な共役脂肪酸の調整法の一つとして、共役二重結合を分子内に有する共役脂肪酸をグリセロールエステルの形態とした共役脂肪酸グリセリドを使用することを提案する。また、かかる共役グリセリドは（例：共役リノール酸を分子内に有するグリセリド）、脂質代謝改善効果、抗肥満効果、高脂血症予防・治療効果を有する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LJ	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明 細 書

### 共役脂肪酸エステル

#### 技術分野

本発明は、共役二重結合を分子内に有する共役脂肪酸を有効に体内に摂取するための共役脂肪酸エステル構造に関し、特に前記共役脂肪酸をグリセロールエステルとしたモノ、ジ、又はトリグリセリドに関する。更に詳しくは、本発明は、脂質代謝改善することができ、動脈硬化、心血管系疾患等のリスクファクターである血中中性脂肪を低下させ、高脂血症を改善させる作用のある共役リノール酸を分子内に有する共役脂肪酸グリセリドに関する。このグリセリドは、医薬品及び飲食品に用いることができる。

近年、生活環境の変化に伴い、過食・運動不足などを原因とする生活習慣病（肥満、糖尿病、高脂血症等）の増加が指摘されており、その発症も低年齢化している。その中で脂質代謝異常症の一つである高脂血症は、動脈硬化症の発症に密接に関連しており、血中脂質レベルのコントロールは重要である。これらの病態は、運動療法、食事療法によりかなり改善することが可能であるが、どちらの方法も実行に移すのにかなりの努力を要するものであり、医師や栄養士等の指導を必要とした。

一方、天然に存在し、食品製造加工中にも生成する共役脂肪酸は、隣り合う炭素が単結合を挟んで二重結合を持つ脂肪酸である。炭素数 18 の脂肪酸分子内に共役ジエンを一個持つ共役リノール酸、あるいは共役ジエンを 2 個持つエレオステアリン酸、共役ジエンを 3 個持つパリナリン酸等が良く知られており、生理活性も研究されている。

とりわけ共役リノール酸に関しては、近年多くの有用な生理活性が報告されている。例えば、特表平 8-505775 号（W094/16690）公報には、共役リノール酸を動物に投与して動物の体重増加と飼料の効率とを高める方法が、特表平 10-508189 号（W096/06605）公報には共役リノール酸を動物に投与して動物の体脂肪を減少させる方法が開示されており、また、その他にも抗腫瘍効果、抗アレルギー効果等の報告がなされている。

共役リノール酸は、植物中にグリセリドの形で存在する脂肪酸であり、また、動物の消化管内で一部の微生物の作用によりリノール酸から変換生成され、吸収される事も知られている。

上記のような各種生理作用を有する共役リノール酸は、工業的にも製造販売され始めている。市販されている共役リノール酸製品としては、例えばリノール油脂社製の CLA80 活性リノール、Maypro 社のトナリン等が挙げられる。これらは、天然のシス型リノール酸(C18:2)をアルカリ下で共役化する事により製造され、主成分は、cis-9, trans-11 あるいは trans-9, cis-11, trans-10, cis-12 の遊離脂肪酸であり、その他いくつかの位置あるいは幾何異性体を含んでいる。

しかしながら、これら遊離脂肪酸型の製品は、脂肪酸特有の渋味と収斂味が強く、そのまま摂取したり、一般食品に生理効果量を添加するには難しい場合も多かった。

また、共役リノール酸は多くの場合カプセルや錠剤型の栄養補助食品として市販されており、これらの剤型を単独摂取した場合、とりわけ食間に摂取した場合には消化吸収性が悪いという難点のあるものであった。

一方、グリセリド型の共役脂肪酸を植物等から多量抽出利用する試みもなされているが、工業的に見合う程度の原料素材は知られていない。

このため、共役脂肪酸グリセリドを酵素反応により合成する試みもなされている。例えば、リパーゼに依るエステル交換法あるいはエステル合成法等の常法により、共役リノール酸をグリセリド誘導体にする試みが幾つか報告されている(Garcia H. S. ら、Biotechnology Letters, 20:4, p393-395, 1998年、Arcos J. A. ら、Biotechnology Letters, 20:6, p617-621, 1998年)。

しかしながら、これらの報告には、リパーゼを用いた合成反応を利用し、モノ、ジ、トリグリセリド誘導体中の共役リノール酸を製造しうることは記載されているものの、生成したグリセリド誘導体の官能的品質や生理効果に付いては全く触れられていない。

#### 発明の開示

本発明は、脂質代謝改善剤、抗肥満剤、及び高脂血症予防・治療剤の製造のため

めの共役リノール酸を代表とする共役脂肪酸を、共役脂肪酸が有する渋味や収斂味を抑制して経口摂取するための共役脂肪酸エステルの使用を提案する。即ち、前記共役脂肪酸が元来有している生理効果を一層有効に発揮させ、共役脂肪酸が有する渋味や収斂味を抑制して、前記共役脂肪酸を経口摂取するに好適な共役脂肪酸の調製法の一つとして、共役二重結合を分子内に有する共役脂肪酸をグリセロールエステルの形態とした共役脂肪酸グリセリドを使用するものである。

この共役脂肪酸グリセリドは、経口摂取であればどのような形態で摂取しても、渋味や収斂味がなく、効率良く吸収できる。

具体的には、本発明は、共役脂肪酸を分子内に有する共役脂肪酸エステルにおいて、該共役脂肪酸をグリセロールエステルの形態とした共役脂肪酸グリセリドを、脂質代謝改善剤、抗肥満剤、及び高脂血症予防・治療剤として用いることができる。

更に、本発明は安全性が高く、食品として日常摂取することができる、共役リノール酸グリセリドを含むグリセリドを提供することを目的とする。

本発明は、共役二重結合を有する共役脂肪酸として、特に共役リノール酸を分子中に有する共役脂肪酸グリセリドを提供する。

更に好ましい態様としては、共役二重結合を有する共役脂肪酸として9，11-オクタデカジエン酸、又は、10，12-オクタデカジエン酸を持つ共役脂肪酸グリセリドを提供する。

また、モノ、ジ又はトリグリセリドからなる群から選ばれた何れか一つの形態を有する共役脂肪酸グリセリドを提供するものである。

この共役脂肪酸グリセリドは、牛乳、豆乳等のこのグリセリドを変性させない飲食品と混合して飲食品に供することができ、カプセル、タブレット等の常法に基づいてグリセリドを変性させない他の医薬基剤と配合して医薬品に供することができる。

本発明の共役脂肪酸グリセリドの製造方法としては、天然のシス型リノール酸をアルカリ下で共役化した後、触媒を使ったエステル合成あるいはエステル交換反応をする方法、或いは脂肪酸含有グリセリドの共役化等いずれの方法を用いてもよい。



中でも、触媒として生体触媒のリパーゼを用いるエステル交換あるいはエステル合成反応が食品用途には好ましく、特にエステル合成反応が好ましい。エステル合成反応は、常法により行えばよい。例えば、共役リノール酸と固定化リパーゼ及びグリセロールとの存在下、脱水しながら反応を行うとよい。この方法によれば、総脂肪中の共役脂肪酸含有量を顕著に増加させることができ、また常温でも反応が進行する上、触媒の失活・除去も容易で脂肪の酸化等の副反応も限定されており安全性も高い。

エステル交換法も安全性は高いものの、反応収率が劣り、副生する脂肪酸の分離も困難である。一方、化学触媒でグリセリドを合成する事も出来るものの、予期せぬ副反応物の恐れや、グリセリドの収率が十分でなかったり、また、化学触媒を除去する煩雑さがある。

エステル交換反応等の基質となる油脂としては、植物油脂として大豆油、コーン油、綿実油、ひまわり油、サフラワー油、菜種油、紅花油、オリーブ油、落花生油、亜麻仁油、しそ油、ヤシ油、パーム油等を挙げることが出来る。動物油としては、いわし油、ニシン油、烏賊肝油等の魚油やバター油、牛脂、豚脂等を挙げる事が出来る。中でも、コーン油、大豆油、パーム油、ヤシ油等が安定性の点から好ましい。また、バター油も風味の点から好ましい。これらは単独あるいは2種以上混合して使用できる。

一方、エステル交換・合成反応に用いる脂肪酸についても特に制約はなく、具体的には遊離型の共役リノール酸、エレオステアリン酸、パリナリン酸等が挙げられる。また、これらを豊富に含む天然物の抽出物や合成法により得られた共役ジエンを複数持つ脂肪酸等を用いてもよい。中でも、共役リノール酸（市販品では CLA80 活性リノール、トナリン等）が種々の生理効果が報告されているため好ましい。

エステル交換の場合、基質となる油脂と共役脂肪酸の比は、トリグリセリド中の共役脂肪酸含量を20%以上にするために重要で、油脂の共役脂肪酸に対する重量比が3.5以下、好ましくは3以下とすることが望ましい。また、反応は有機溶剤を添加しても進行するものの、油脂と共役脂肪酸の混合物が溶液状態を保つ温度であれば有機溶剤が無くても反応は十分進行する。

エステル交換・合成反応を触媒するリパーゼは総て本発明の目的に利用できる。市販されているものの例を挙げれば、パンクレアチンF、リパーゼA, F, M, AY, G, P S、ニューラーゼF（天野製薬（株））、リパーゼCV（旭化成（株））、リパーゼOF, AL, PL, QL（名糖産業（株））、Novozyme, Lipozyme（ノボ社：固定化酵素）等である。共役脂肪酸含量20%以上を達成するためには、リパーゼAY, P L, CV, Novozyme, Lipozymeがエステル合成・交換反応活性が高く好ましい。

添加する酵素量は、固定化酵素の場合基質量に対して0.1~15%、好ましくは2~7%の範囲である。一方、リパーゼAY, P L, CVを用いる場合には添加する酵素量は、基質量に対して0.1~10%、好ましくは0.5~3%の範囲である。

また、グリセリド誘導体中の共役脂肪酸含量を20%以上とするためには、エステル交換、あるいはエステル合成反応条件を最適なものにしないと達成は難しい。すなわち、酵素の選択や、基質となる油脂と脂肪酸の比、水分含量の調節等の反応条件が重要となる。

エステル交換反応は、水分が無いと交換反応はほとんど進行せず、反応系に150~2000ppmの水分が存在すると反応が最大限に進行し好ましい。エステル交換反応では水の生成はないので、共役脂肪酸の十分な含有量、例えば20%以上を達成するには、反応開始時に反応系の水分量を調整しておくことが望ましい。

一方、エステル合成反応は副生する水を、反応系の減圧や加熱、モレキュラーシーブの添加、循環気相の乾燥等で脱水する事が好ましい。得られる反応物には、基質に用いた共役脂肪酸組成がほぼ反映される。

また、エステル合成あるいは交換反応終了物中に未反応の脂肪酸やグリセロールが品質に影響する程度残存している場合には、時には分別除去する必要も生じる。反応物はモノ、ジ、トリグリセリドの混合物である場合が多く、時にはそれらの分画も必要になる。反応物からそれらの不要な成分を除くためには、分子蒸留、水洗、ケン化分別、クロマトグラフィー等が考えられる。産業的には分子蒸留がもっとも汎用され分別程度も良好である。ケン化分別法としては、脂肪酸を

ケン化処理して石鹼として水性溶媒に分画除去、あるいは不溶性塩として除去する方法等があるが、この場合は残存脂肪酸が20%以下でないと高粘性のために実施は難しい。クロマトグラフィーは分別程度は良好であるものの、コスト高である。

更に、共役脂肪酸グリセリドは、二重結合を2個以上有する脂肪酸の少なくとも1種以上を構成成分とする脂肪酸グリセリド又は該脂肪酸グリセリドの含有されている油脂含有素材に、共役二重結合産生能力を有する微生物又は該微生物の産生する酵素を作用させることにより製造することも可能である。ここで、共役二重結合産生能力とは、前記二重結合を2個以上有する脂肪酸を構成成分とする脂肪酸グリセリド又は該脂肪酸グリセリドの含有されている油脂含有素材を、直接共役脂肪酸グリセリドに変換する能力のことである。

二重結合を2個以上有する脂肪酸の少なくとも1種以上を構成成分とする脂肪酸グリセリドとしては、例えばリノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)等の二重結合を2つ以上有する脂肪酸の1種または2種以上を構成成分とするグリセリドが挙げられる。

また、これらのグリセリドを豊富に含有する油脂素材として、具体的には、サフラワー油、大豆油、コーン油、菜種油、綿実油、ひまわり油、紅花油、ごま油、オリーブ油、亜麻仁油、エゴマ油等の植物油、バター油、魚油、ラード、牛脂等の動物油等が挙げられる。より好ましくは、例えば、炭素数18の脂肪酸、特にリノール酸が多い点から、サフラワー油、大豆油、コーン油、菜種油、綿実油、ひまわり油、紅花油等の植物性油脂が好ましい。

本発明における共役二重結合産生能力を有する微生物とは、反応の出発物質となる上記のグリセリドまたは油脂素材を直接共役脂肪酸グリセリドに変換する能力を有する微生物のことである。反応時には、微生物をそのまま作用させてもよいが、微生物を担体に固定化し、バイオリアクターとして作用させてもよい。また、微生物の産生する酵素を回収、精製、或いは粉末化し、そのまま或いは適当な担体に固定化し、バイオリアクターとして作用させてもよい。

また、本発明で用いる微生物としては、特に限定されるものではなく、共役二

重結合産生能力を有する微生物であればよい。例えば、本発明の共役二重結合産生能力を有する微生物としては、古くから発酵乳製品等に利用されているものも多く含まれ、病原性を有さないことが確認されている等の安全性の点から、腸管系微生物、即ち、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属、エンテロコッカス属、ロイコノストック属等に属する乳酸菌や、ビフィドバクテリウム属細菌、ユーバクテリウム属細菌、プロピオニバクテリウム属細菌等が好ましい。

具体的な共役二重結合産生能力を有する微生物としては、例えば、ラクトバチルス属細菌としては、ラクトバチルス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ブレビス(*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・ブフネリ(*Lactobacillus buchneri*)、ラクトバチルス・カゼイ(*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ、デルブルッキ(*Lactobacillus delbrueckii*(ss. *delbrueckii*))、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ、ラクチス(*Lactobacillus delbrueckii*(ss. *lactis*))、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ、ブルガリカス(*Lactobacillus delbrueckii*(ss. *bulgaricus*))、ラクトバチルス・ガッセリ(*Lactobacillus gasserii*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス(*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・ジョンソニー(*Lactobacillus johnsonii*)、ラクトバチルス・オリス(*Lactobacillus oris*)、ラクトバチルス・ロイテリ(*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバチルス・ラムノーザス(*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチルス・ゼアエ(*Lactobacillus zeae*)、ラクトバチルス・サケ(*Lactobacillus sakei*)等から選ばれる。

また、ラクトコッカス属細菌としては、ラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)、ラクトコッカス・プランタラム(*Lactococcus plantarum*)、ラクトコッカス・ラフィノラクチス(*Lactococcus raffinolactis*)等から選ばれる。ロイコノストック属細菌としては、ロイコノストック・ラクチス(*Leuconostoc lactis*)等から選ばれる。ストレプトコッカス属細菌としては、ストレプトコッカス・サーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)等から選ばれる。エンテロコッカス属細菌としては、エンテロコッカス・フェカーリス(*Enterococcus faecalis*)、エ

ンテロコッカス・フェシウム(*Enterococcus faecium*)等から選ばれる。ビフィドバクテリウム属細菌としては、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス(*Bifidobacterium adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・カテニューラータム(*Bifidobacterium catenulatum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)等から選ばれる。ユーバクテリウム属細菌としては、ユーバクテリウム・アエロファシエンス(*Eubacterium aerofaciens*)、ユーバクテリウム・バイフォーム(*Eubacterium biforme*)、ユーバクテリウム・コプロスタノリジェンス(*Eubacterium coprostanoligens*)等から選ばれる。プロピオニバクテリウム属細菌としては、プロピオニバクテリウム・フロイデンライキ(*Propionibacterium freudenreichii*)等から選ばれる。

中でも、ラクトバチルス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ブレビス(*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ. デルブルッキ(*Lactobacillus delbrueckii*(ss. *delbrueckii*))、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ. ブルガリカス(*Lactobacillus delbrueckii*(ss. *bulgaricus*))、ラクトバチルス・ガッセリ(*Lactobacillus gasseri*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス(*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・ジョンソニー(*Lactobacillus johnsonii*)、ラクトバチルス・オリス(*Lactobacillus oris*)、ラクトバチルス・ロイテリ(*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバチルス・サケ(*Lactobacillus sakei*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*)、ユーバクアリウム・バイフォーム(*Eubacterium biforme*)、ユーバクテリウム・コプロスタノリジェンス(*Eubacterium coprostanoligens*)、プロピオニバクテリウム・フロイデンライキ(*Propionibacterium freudenreichii*)等が共役脂肪酸グリセリドの生産性が高く好ましい。

より具体的には、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*) YIT4007(FERM BP-791)株、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*Bifidobacterium infantis*) YIT4018(ATCC15697)株、YIT4019(ATCC15702)株、ラクトバチ

ルス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)YIT0070(ATCC4356)株、ラクトバチルス・ブレビス(*Lactobacillus brevis*)YIT0033(NIRD T-6)株、YIT0076(ATCC14869)株、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ、デルブルッキ(*Lactobacillus delbrueckii*(ss. *delbrueckii*))YIT0080(ATCC9649)株、ラクトバチルス・デルブルッキ サブスピーシーズ、ブルガリカス(*Lactobacillus delbrueckii*(ss. *bulgaricus*))YIT0181(ATCC11842)株、ラクトバチルス・ガッセリ(*Lactobacillus gasserii*)YIT0168株、YIT0192(DSM20243)株、ラクトバチルス・ヘルベティカス(*Lactobacillus helveticus*)YIT0083(ATCC15009)株、YIT0085(ATCC 521)株、ラクトバチルス・ジョンソニー(*Lactobacillus johnsonii*)YIT0202(JCM 1022)株、ラクトバチルス・オリス(*Lactobacillus oris*)YIT0277(NCFB2160)株、ラクトバチルス・ロイテリ(*Lactobacillus reuteri*)YIT0313株、ラクトバチルス・サケ(*Lactobacillus sakei*)YIT0247(JCM1157)株、プロピオニバクテリウム・フロイデンライキ(*Propionibacterium freudenreichii*)ATCC6207株、ユーバクアリウム・バイフォーム(*Eubacterium biforme*)YIT6076(ATCC27806)株、ユーバクテリウム・コプロスタノリジェンス(*Eubacterium coprostanoligenes*)YIT6166(ATCC 51222)株等が挙げられる。

上記微生物を用いた製造法において、微生物をそのまま用いる場合には、洗浄生菌体を乳化油脂と混合し反応させるか、或いは油脂素材含有食品に該微生物を接種し、培養したり、洗浄生菌体と混合して反応させたものを用いればよい。固定化してバイオリクターとして用いる場合には、例えば、菌体酵素をそのまま用いるか、或いは生菌体を粉碎後、塩析や膜処理、イオン交換樹脂処理、ゲル濾過処理等の通常の分画方法で酵素を精製し、イオン結合や共有結合、疎水結合法によりシリカゲル、セライト、イオン交換樹脂、キトサンビーズ、セルロース等の担体に固定化して用いることができる。

得られた反応物はそのまま、又は、好ましくは更に精製を行って用いる。具体的な精製法としては、水相に懸濁している場合には、遠心分離で油相を回収し、これを有機溶媒で抽出して精製する。抽出溶媒としては、共役二重結合を含む共役脂肪酸グリセリドを溶出することのできる溶媒を常法に従って用いる。こうして得られた共役脂肪酸グリセリドを含む反応組成物は、分画した油分をそのまま

使用することもできる。

本発明の共役脂肪酸グリセリドとしては、分子内に共役二重結合を有する脂肪酸、具体的には共役リノール酸、エレオステアリン酸、パリナリン酸等をグリセリドの形態としたものであれば、いずれも好適に使用できる。また、グリセリドの形態は、モノ、ジ、又は、トリのどの形態でもよいが、共役脂肪酸を1分子中に多く含むジ、トリ型を多く含むものが望ましい。

このようなグリセリドの形態とすることで、遊離の脂肪酸のみならず、メチルエステル等他のエステル類と比べても、風味の改善、消化吸収の促進効果等が高くなり、また、これに付随する抗肥満効果、脂質代謝改善効果、高脂血症の予防・治療効果等も増強される。

また、生理効果の期待できる有効量（例えば共役リノール酸の場合一日1～3g）の共役脂肪酸グリセリドを、適正脂肪摂取量内で摂取するためには、該誘導体中の共役脂肪酸含量が20%以上である事が望ましい。もしグリセリド中の共役脂肪酸含量が20%未満になると5～15g以上の誘導体を摂る事になって摂取カロリーが増えるために、共役脂肪酸により期待できる生理効果、例えば体脂肪の減少や、癌の予防効果等が減殺される虞が大きくなる。

上記のようにして得られる共役脂肪酸グリセリドは、安全性において全く問題はない。また、共役脂肪酸グリセリドの摂取量としては1人1日あたり100mg～5000mg、特に300mg～3000mgが好ましい。

前述の種々の反応によって得られた本発明の共役脂肪酸グリセリドは、これを含む油脂組成物のまま使用することもできるが、一般の飲食物、あるいはタブレット、カプセル、顆粒、サラダ油状食品等に混入・加工して使用することも可能である。これらの剤形、主にカプセルや顆粒状では、共役脂肪酸グリセリドの持つ優れた消化吸収性により、摂取時の空腹度合い等による吸収効率の低下といった遊離型の問題点が特に解消されるため好ましい。

より具体的には、種々の反応によって得られた本発明の共役脂肪酸グリセリドを含む油脂組成物は、分画、殺菌、混合、濃縮、乾燥等の加工をした後、他の飲食物又は経口投与可能な物質と共に医薬品又は飲食品として用いることができる。例えば、各種フレーバーや、果汁粉末、砂糖・果糖等の甘味料、クエン酸・リ

ンゴ酸等の酸味料、安定剤、増粘剤、穀物粉、ビタミン類、ミネラル類等と混合して、パン、麺類、焼き菓子、クリーム、飴、チューインガム、錠菓、お茶、コーヒー、果汁飲料、発酵乳、炭酸飲料、プリン、ゼリー等の形態で用いることができる。同様に、タブレット、カプセル、顆粒あるいはサラダ油状食品等に加工して栄養補助食品の形態で用いる事が出来る。

また、共役脂肪酸グリセリドを食品の形態で用いる場合において、該食品中に共役脂肪酸以外の脂質を併用する際には、リノール酸含量の少ない油脂素材を用いることが望ましい。具体的には、バター油、魚油、シソ油、エゴマ油、パーム油、ヤシ油、アマニ油、オリーブ油、牛脂、ラード等の油脂を用いることが好ましい。リノール酸を多量に含む油脂を併用すると、共役脂肪酸グリセリドの有する生理効果、即ち、抗肥満効果、油脂代謝改善効果、高脂血症の予防・治療効果等が阻害される可能性があるためである。

本発明の共役脂肪酸グリセリドは、共役脂肪酸特有の苦味や収斂味が抑制され、かつ消化吸収性も改善されているため、これを用いれば、風味良好かつ何時どのような状況で摂取しても効率よく吸収することが可能となる。

また、本発明の脂質代謝改善用共役脂肪酸グリセリドを用いれば、種々の優れた生理効果を有する共役脂肪酸を、各種の呈味改善剤等を併用することなく、継続的に摂取でき、優れた内臓脂肪減少効果、抗肥満効果、体重減少効果が得られ、また抗糖尿病効果、抗動脈硬化症効果、抗ガン効果等も期待できる。また、共役リノール酸を分子内に有する共役脂肪酸グリセリドは、高脂血症を顕著に改善し、動脈硬化、糖尿病、心血管疾患等のリスクを軽減させる。

#### 図面の簡単な説明

図1は各種油脂原料と共役リノール酸とのエステル交換反応における、グリセリド中の共役リノール酸の価数の変化を経時的に示した線図である。図において、縦軸はグリセリド中の共役リノール酸の価数、横軸は37℃の反応時間(hr)であり、◆はバター、■はコーン油、▲はヤシ油、●はイワシ油である。

図2は共役リノール酸含有脂質の吸収速度を示す線図である。図において、縦軸は血中トリグリセリド濃度(mg/dl)、横軸は時間(hr)であり、◆はCLA（共役



リノール酸)、■はCLA-TG (共役リノール酸含有トリグリセリド)、▲はコントロールである。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

##### [実施例1. 共役リノール酸グリセリドの製造1、エステル交換反応]

300mLのメディウム瓶に酵素リパーゼPL (1g)、水400 $\mu$ L、ヘキサン95mL、さらにバター油、ヤシ油、コーン油の各58gか、いわし油の69gを加え、さらに活性リノール (リノール油脂 (株)、共役リノール酸73.6%含有) 56gを添加して窒素を充填・密栓し、37℃で91時間、往復振とう機で攪拌しながら反応させた。所定時間ごとに10 $\mu$ Lのサンプルを採取・希釈し、薄層クロマトグラフィーで分析した。その結果を図1に示した。この反応では油脂中の脂肪酸と共役リノール酸含量は等モルに設定されているので、反応が平衡に達した時のグリセリド中の共役リノール酸の価数は1.5と計算される。バター油やいわし油では反応2時間で既にグリセリド中に取り込まれた共役リノール酸含量は20% (グリセリド中の共役リノール酸0.6価に相当) を超えている事が分かる。

##### [実施例2. 共役リノール酸グリセリドの製造2、エステル合成反応]

CLA80 (リノール油脂株式会社製) 100g、グリセロール (食添用) 11g、Lipozyme IM (ノボ・ノルディスク社製) 11.3gをナスフラスコに秤量する。これをロータリーエバポレーターで減圧乾固させながら、約70℃で攪拌し、エステル合成反応を12時間行った。反応物からLipozyme IMを濾別し、共役リノール酸グリセリドを得た。得られた反応物を薄層クロマトグラフィー、沃素発色により定量した。その結果、トリグリセリドが85.5%であり、ジグリセリド13.5%、モノグリセリド1%以下で、未反応の脂肪酸が4%、未反応のグリセロールが2%以下であった。

## [実施例 3. 乳酸菌のスクリーニング]

リノール酸含有油脂に作用して、直接共役リノール酸を生成する能力のある微生物をスクリーニングした。まず、表 1 及び表 2 に示した各種乳酸菌、ビフィドバクテリウム属細菌及びプロピオニバクテリウム属細菌を、0.035%リノール酸含有 MRS 培地で培養し、遠心分離により菌体を回収し、生理食塩水で 3 回洗浄して洗浄菌体を調製した。また、ユーバクテリウム属細菌も培地として BCM 培地を用いて嫌気条件で培養する以外は、上記と同様に処理して洗浄菌体を得た。

これらの洗浄生菌体 100  $\mu$ L を、5 mg のリノール酸を含む 1 mL の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.1) に混合し、37°C で 2 日間振盪して反応を行わせた後、遠心分離し、上清を 2 倍量のクロロホルム：メタノール (1：2) で抽出してクロロホルム層に脂質を抽出した。抽出した脂質は、ヘキサンで適宜希釈し、紫外線吸収スペクトルを測定して共役リノール酸の生成を調べた。

更に、共役リノール酸の生成が認められた菌株はリノール酸の代わりに 5 mg のコーン油を含む乳化液を用い、同様の方法で処理して紫外線吸収スペクトルを測定した。尚、コーン油中のリノール酸含量は約 50% である。

その結果、次の表 1 及び表 2 に○印で示した菌が、リノール酸グリセリド含有油脂を共役リノール酸グリセリドに変換する能力を有する菌であることが判った。尚、抽出した脂質に遊離の脂肪酸が含まれているかを薄層クロマトグラフィーで調べたところ、遊離脂肪酸のバンドは殆ど検出されなかったため、生成した共役脂肪酸はグリセリド型であることが判った。

また、リノール酸を強く異性化できるものの、グリセリド型リノール酸を異性化する能力が弱い菌（各表中のコーン油で×印のついている菌）もいることから、リノール酸を異性化する菌がグリセリド型リノール酸を必ずしも異性化できる訳ではないことも判った。

表 1

No	属名	種名	共役リノール酸ゲ リセリド生成能		YIT番号	寄託番号
			リノール酸	コリン油		
1	<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>	×		YIT4011	ATCC15703
2	<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>	×		YIT4087	JCM7042
3	<i>Bifidobacterium</i>	<i>bifidum</i>	○	○	YIT4007	FERM BP-791
4	<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	○	×	YIT4014	ATCC15700
5	<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	×		YIT4065	
6	<i>Bifidobacterium</i>	<i>catenulatum</i>	×		YIT4016	ATCC27539
7	<i>Bifidobacterium</i>	<i>catenulatum</i>	○	×	YIT4118	JCM7130
8	<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	○	○	YIT4018	ATCC15697
9	<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	○	○	YIT4019	ATCC15702
10	<i>Bifidobacterium</i>	<i>lactis</i>	○	×	YIT4121	DSM10140
11	<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	○	×	YIT4021	ATCC15707
12	<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	×		YIT4037	ATCC15708
13	<i>Bifidobacterium</i>	<i>pseudocatenulatum</i>	×		YIT4072	JCM1200
14	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	○	○	YIT0070	ATCC4356
15	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	○	○	YIT0033	NIRD T-6
16	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	○	○	YIT0076	ATCC14869
17	<i>Lactobacillus</i>	<i>buchneri</i>	×		YIT0040	NIRD BC-1
18	<i>Lactobacillus</i>	<i>buchneri</i>	×		YIT0077	ATCC4005
19	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	×		YIT0180	ATCC334
20	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	×		YIT9018	
21	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	×		YIT9029	
22	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i> (ss. <i>delbrueckii</i> )	○	○	YIT0080	ATCC9649
23	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i> (ss. <i>lactis</i> )	×		YIT0058	NIRD L-10
24	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i> (ss. <i>lactis</i> )	×		YIT0086	ATCC12315
25	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii</i> (ss. <i>bulgaricus</i> )	○	○	YIT0181	ATCC11842
26	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	○	○	YIT0168	
27	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>	○	○	YIT0192	DSM20243
28	<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	○	○	YIT0083	ATCC15009
29	<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	○	○	YIT0085	ATCC521
30	<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	○	○	YIT0202	JCM1022

表 2

No	属名	種名	共役リノール酸ゲ リセリド生成能		YIT番号	寄託番号
			リノール酸	コリン油		
31	<i>Lactobacillus</i>	<i>oris</i>	○	○	YIT0277	NCFB2160
32	<i>Lactobacillus</i>	<i>parabuchneri</i>	×		YIT0272	NRIC1780
33	<i>Lactobacillus</i>	<i>pentosus</i>	×		YIT0238	JCM1558
34	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	×		YIT0101	ATCC8014
35	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	×		YIT0102	ATCC14917
36	<i>Lactobacillus</i>	<i>pontis</i>	×		YIT0273	DSM8475
37	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	○	○	YIT0313	
38	<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	○	×	YIT0105	ATCC7469
39	<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	○	×	YIT0124	ATCC9595
40	<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i> (ss. <i>salicinius</i> )	×		YIT0089	ATCC11742
41	<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i> (ss. <i>salivarius</i> )	×		YIT0104	ATCC11741
42	<i>Lactobacillus</i>	<i>sanfrancisco</i>	×		YIT0240	JCM5668
43	<i>Lactobacillus</i>	<i>sakei</i> (ss. <i>sakei</i> )	○	○	YIT0247	JCM1157
44	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> (ss. <i>cremoris</i> )	×		YIT2002	ATCC14365
45	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> (ss. <i>cremoris</i> )	×		YIT2007	ATCC19257
46	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> (ss. <i>lactis</i> )	×		YIT2008	ATCC19435
47	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i> (ss. <i>lactis</i> )	×		YIT2027	
48	<i>Lactococcus</i>	<i>plantarum</i>	×		YIT2061	ATCC43199
49	<i>Lactococcus</i>	<i>raffinolactis</i>	×		YIT2062	ATCC43920
50	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>	○	×	YIT3001	ATCC19256
51	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>	×		YIT3004	NCD0532
52	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	×		YIT2001	
53	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	×		YIT2037	ATCC19258
54	<i>Propionibacterium</i>	<i>freudenreichii</i>	○	○		ATCC6207
55	<i>Eubacterium</i>	<i>aerofaciens</i>	×		Y 98010	ATCC25986
56	<i>Eubacterium</i>	<i>limosum</i>	×		YIT6067	JCM6421
57	<i>Eubacterium</i>	<i>biforme</i>	○	○	YIT6076	ATCC27806
58	<i>Eubacterium</i>	<i>lentum</i>	×		YIT6077	ATCC25559
59	<i>Eubacterium</i>	<i>rectale</i>	×		YIT6082	ATCC33656
60	<i>Eubacterium</i>	<i>coprostanoligenes</i>	○	○	YIT6166	ATCC51222

## [実施例4. グリセリド体の調製と吸収試験]

実施例1のコーン油で得られた反応生成物9g(残存脂肪酸量3.6g、グリセリド5.4g、グリセリド中の共役リノール酸含量35%)を、予めpH7の緩衝液で平衡化後、エタノールで置換し、さらにヘキサンで置換したDEAEセルロースカラム(乾燥樹脂量60g、カラムφ3.5×30cm)に吸着させ、ヘキサンで溶離し、非吸着部を回収後、ロータリーエバポレーターで溶剤を除去し5gの乾固物を得た。この脂質組成を薄層クロマトグラフィーで調べた結果、グリセリド誘導体が96%、混在する脂肪酸が4%の組成であり、乾固物の29%が共役リノール酸であった。

この乾固物を、一晚絶食させた19週齢の雄ICRマウスに胃ゾンデにより投与し(5mL/kg、n=5)、対照として、3重量部の活性リノール(リノール油脂(株)製;共役リノール酸を70%含む)とリノール酸を4部混合したものを、同様に投与した。また、もう一つの対照として非投与群を置いた。経時的に3群の眼窩採血を行い血中のトリグリセリド量を測定した。その結果、本発明によるグリセロール誘導体の方が、対照の遊離脂肪酸タイプのものより消化吸収性の良い事が明らかとなった(図2)。各群の2頭の血液試料をガスクロマトグラフィーにより脂肪酸の分析を行ったところ、いずれも共役リノール酸が認められた。

## [実施例5. 共役リノール酸グリセリドの製造3、含有乳飲料の調製]

表1の乳酸菌の中から*Bifidobacterium infantis* YIT4018株、*Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* YIT0181株、*Lactobacillus helveticus* YIT0085株の3菌株について共役リノール酸グリセリド生成試験を行った。サフラワー油(リノール酸73%含有)を対油脂重量0.5%のポリグリセリン脂肪酸エステル(MSW750、阪本薬品工業(株))を含む等量の水溶液に滴下しながら、ヒスコトン乳化機で乳化して50%油脂乳化物とした。これに、0.035%リノール酸含有MRS培地で培養したそれぞれの菌株の洗浄生菌体を湿重量で油脂の約20分の1重量部添加し、37℃で2日間反応させて、該反応液から脂肪を抽出し、ヘキサンで適宜希釈し紫外線吸収スペクトルを測定して共役リノール酸グ

リセリドの生成を調べた。尚、実施例3と同様に薄層クロマトグラフィーにより遊離の脂肪酸量も測定した。

その結果、*Bifidobacterium infantis* YIT4018株、*Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* YIT0181株、及び*Lactobacillus helveticus* YIT0085株の全てで共役リノール酸のグリセリドが生成していることが判った。

また、*Lactobacillus helveticus* YIT0085株で調製した共役リノール酸を含む油脂を乳製品に添加混合して、共役リノール酸グリセリド含有食品を製造した。即ち、遠心分離器によりクリームを一部除去して乳脂肪分1.1%とした低脂肪牛乳99.6重量部に0.4重量部の該油脂を乳化混合し、共役リノール酸グリセリドを含む牛乳を製造した。この牛乳は風味も良好で物性も安定していた。

#### [実施例6. 共役リノール酸グリセリドの製造4、含有豆乳飲料の調製]

表1及び表2の乳酸菌から、*Bifidobacterium bididum* YIT4007株、*Lactobacillus helveticus* YIT0085株、*Lactobacillus reuteri* YIT0313株の3菌株について発酵豆乳製造中の共役リノール酸グリセリド生成試験を行った。

5%の大豆油（リノール酸52%、リノレン酸8%を含む）を含む豆乳（無脂肪固形分8.3%）を100℃で60分間加熱殺菌して夫々の菌株を接種し、37℃で2日間培養し、発酵豆乳を製造した。各発酵豆乳から脂肪を抽出し、235nmの吸光度を測定して共役リノール酸の生成を調べた。

その結果、いずれもリノール酸が共役リノール酸に変換されていることがわかった。なお、一部の共役二重結合はリノレン酸からも生じている可能性があるものの確認は出来なかった。また、発酵豆乳中の遊離脂肪酸は増加していなかったため、生成した共役リノール酸はグリセリド誘導体のリノール酸がそのまま共役リノール酸に変換されたことが判った。

#### [実施例7. 菌体酵素の調製]

表1に示した酪農乳酸菌から、*Lactobacillus helveticus* YIT0085株の10ml培養分の洗浄生菌体を2mlの10%リゾホスファチジルグリセロール溶液に懸濁し、50℃、30分間加熱処理して菌体酵素を調製した。これを実施例5の方

法に従い生菌体の代わりに添加して反応を行った結果、共役脂肪酸グリセリドが生成していることを紫外線吸収スペクトル測定及び薄層クロマトグラフィーで確認した。

#### [実施例 8. 抗肥満試験]

実施例 2 で得た共役リノール酸含有グリセリド (TG-CLA) を、卵巣摘出マウスに 0.5% 投与して内臓脂肪蓄積への影響を調べた。すなわち、6 週齢の C57BL/6J マウス (♀) 36 匹を日本 SLC (株) より購入した。MF 食で 1 週間予備飼育した後、常法に従い左右の卵巣の摘出手術を施した。

1 週間の回復の後、9 匹ずつ 4 群に分け、表 3 に示した実験飼料をそれぞれ 7 週間自由摂取させた。一晚絶食後、エーテル麻酔下で開腹し、採血後直ちに腎臓、子宮、腸間膜周辺の脂肪組織を摘出秤量し、内臓脂肪重量とした。実験期間を通じて飼育条件は恒温 ( $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ )、恒湿 ( $60 \pm 5\%$ ) とし、明暗周期は 12 時間に設定した。飼料及び水は自由摂取とし、毎週体重と摂餌量を測定した。

尚、摂餌量は 1 ケージ 3 匹ずつ飼育を行ったため、実際には 3 匹が 1 週間に摂取した量を測定した。データは全て平均値  $\pm$  標準偏差で表わした。各群間の平均値の差の検定には Tukey の多重比較検定を用いた。

その結果、摂餌量に差は見られず、また、実験期間中の体重増加率 (%) はそれぞれ本発明品群 ;  $35.8 \pm 5.4$ 、コーン油群 ;  $38.3 \pm 8.8$ 、アマニ油群 ;  $47.5 \pm 11.3$ 、魚油群 ;  $40.2 \pm 5.9$  であった。アマニ油群は他の群に比べて体重の増加が大きく、6 週目と 7 週目には本発明品群がアマニ油群に対して有意に低い値を示した ( $p < 0.05$ )。解剖時の体重、内臓脂肪重量を表 4 に示した、内臓脂肪重量は本発明品群がコーン油群、アマニ油群に対してそれぞれ 30%、38% 低い値を示し、有意な差が認められた ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ )。また、有意差は検出されなかったものの、体脂肪を下げるかとされている魚油に対しても本発明品群は体重に対する内臓脂肪重量が低い傾向に有り ( $p = 0.13$ ) 本発明品の優れた効果が確認できた。

表3 実験飼料組成

	本発明品 %	コーン油 %	アマニ油 %	魚油 %
カゼイン	24	24	24	24
大豆ペプチド*	1	1	1	1
コーンスターチ	13.3	13.3	13.3	13.3
シュクロース	50	50	50	50
コーン油	4.5	5	—	—
実施例2の(TG-CLA)	0.5	—	—	—
アマニ油	—	—	5	—
魚油	—	—	—	5
セルロース	2	2	2	2
ビタミン混合**	1	1	1	1
ミネラル混合**	3.5	3.5	3.5	3.5
重酒石酸コリン	0.2	0.2	0.2	0.2

\* ハイニュートR (不二製油)、

\*\* AIN76配合

表4. 体重、内臓脂肪重量の比較

	本発明品群 N = 9	コーン油群 N = 9	アマニ油群 N = 9	魚油 N = 9
体重 (g)	25.94 ± 1.26 <sup>a</sup>	26.80 ± 2.04	28.50 ± 2.10 <sup>b</sup>	28.50 ± 1.46
内臓脂肪 (g)	1.24 ± 0.46 <sup>a</sup>	1.84 ± 0.49 <sup>b</sup>	2.17 ± 0.41 <sup>d</sup>	1.63 ± 0.25
内臓脂肪 (%)	4.97 ± 1.51 <sup>a</sup>	7.12 ± 1.40 <sup>c</sup>	7.97 ± 0.97 <sup>d</sup>	6.31 ± 0.78

a vs b, p&lt;0.05、a vs c, p&lt;0.01、a vs d, p&lt;0.001 (Tukeyの多重比較検定)

## [実施例9. 血中トリグリセリドの比較試験1]

左右の卵巣を摘出した7週齢のC57BL/6Jマウスを3群に分け、1.2%サフラワー油添加MF飼料(対照群)、0.67%サフラワー油と実施例2と同様の方法で調製した共役リノール酸グリセリド(TG-CLA)を0.53%含むMF飼料(0.53%TG-CLA群)、及び1.2%TG-CLA添加MF飼料(1.2%TG-CLA群)をそれぞれ自由摂取させた。使用したTG-



C L Aの脂肪酸組成は表5に示すように、9c, 11t/9t, 11c-18:2及び10t, 12c-18:2が主な脂肪酸であり、トリグリセリドが80%以上のものであった。

8週間の飼育後、4時間絶食を行った各群8匹のマウスについてエーテル麻酔下で心臓採血し、血中トリグリセリドの分析を市販のキット（トリグリセライドGテストワコー）を用いて行った。その結果を表6に示す。尚、血中中性脂肪は1.2% T G - C L A群で有意に低い値を示した。

表5 T G - C L Aの組成

脂肪酸組成	(%)
16:0	6.9
18:0	2.7
18:1	15.1
18:2(非共役)	0.8
共役リノール酸18:2	73.6
(c9, t11/t9, c11)	(34.5)
(t10, c12)	(35.2)
(その他異性体)	(3.9)
グリセリド誘導体組成	(%)
トリグリセリド	83.4
ジグリセリド	12.4
モノグリセリド	0
遊離脂肪酸	4.2

表6 血中トリグリセリドの比較

	血中 T G (mg/dl)	p
対照群	42.0±8.5	
0.53% T G - C L A 群	39.0±6.8	0.590
1.2 % T G - C L A 群	29.0±4.7	0.002

p (Dunnett多重比較検定、各群8匹)

表6に示す通り、食事中的脂質の一部を共役リノール酸グリセリドに置き換えることで血中中性脂肪を低下させる効果を十分発揮することがわかった。このことから共役リノール酸グリセリドの使用による閉経後の代謝異常がもたらす高脂血症の軽減効果等が期待できる。

〔実施例10. 血中トリグリセリドの比較試験2〕

7週齢の雄性C57BL/KsJ, db/dbマウスを1週間予備飼育後、3群に分けて、実施例9と同様の飼料を自由摂取させた。投与開始前、開始後2, 4, 6週間目に眼窩採血し、血中中性脂肪の分析を行った。その結果を表7に示す。尚、血中トリグリセリドは対照群と比較して有意に低い値を示した。

表7に示す通り、実施例9と同様に、食事中的脂質の一部を共役リノール酸グリセリドに置き換えることで血中中性脂肪を低下させる効果を十分発揮することがわかった。このことから共役リノール酸グリセリドの使用によるII型糖尿病における高脂血症の改善等が期待できる。

表7 血中トリグリセリドの比較

	血中TG (mg/dl)			
	投与開始前	2週後	4週後	6週後
対照群	373.9±159.5	768.2±275.9	596.9±151.8	681.4±159.0
0.53%TG-CLA群	387.9±118.5	448.7±182.0*	294.6±75.1**	398.8±122.6**
1.2%TG-CLA群	399.5±131.8	485.5±44.0*	296.7±99.8**	482.7±82.9*

\* p < 0.05、\*\* p < 0.001 (Dunnett多重比較検定、各群7匹)

〔実施例11. 官能検査〕

実施例2及び実施例4の共役リノール酸含有グリセリドと、対照として市販の共役リノール酸（活性リノール、リノール油脂社製）を用い、10人のパネラーによる官能検査により嗜好性の検定を行った。その結果、本発明のグリセリド誘導体は脂肪酸の嫌味が無く、ほとんど無味無臭の標品である事が分かった（表8

）。

尚、官能検査は、10名で行い平均スコアで表した。採点基準は次の通りである。無味0点、やや渋い1点、少し渋い2点、かなり渋い3点、非常に渋い4点。

表 8

本発明品1(実施例2)	本発明品2(実施例4)	対照 市販品(活性リノール)
0 点	0. 1 点	3. 8 点

[実施例12. 軟カプセル剤の製造1]

下記処方に従い、ゼラチン・グリセロール・水でカプセル基剤を製し、カプセル基剤にて含有油を被包成型して軟カプセル剤を調製した。

(処方)

ゼラチン 0. 4 2 7 5 g

グリセロール 0. 0 2 2 5 g

水 0. 0 5 g

実施例2の共役リノール酸グリセリド 2. 0 g

得られた軟カプセル剤は良好な風味を有していた。

[実施例13. タブレットの製造1]

下記に示す処方で各種成分を混合、打錠して、タブレットを製造した。

(処方)

乳糖 1 0 g

実施例2の共役脂肪酸グリセリド含有油 2 5 0 m g

パントテン酸カルシウム 1 0 m g

ビタミンB<sub>2</sub> 4 m g

D KエステルF-20W (第一工業製薬製) 4 0 0 m g

微細化セルロース 6 g

デキストリン 8 g

得られたタブレットは良好な風味を有していた。

[実施例 14. タブレットの製造 2]

下記に示す処方で各種成分を混合、打錠してタブレットを製造した。その結果、得られたタブレットは良好な風味を有していた。

(処方)

乳糖	10 g
実施例 7 の共役脂肪酸グリセリド含有油	250 mg
パントテン酸カルシウム	10 mg
ビタミン B 2	4 mg
DKエステル F-20W (第一工業製薬製)	400 mg
微細化セルロース	6 g
デキストリン	8 g

## 請求の範囲

1. 共役二重結合を有する共役脂肪酸、好ましくは共役リノール酸を分子内に有する共役脂肪酸エステルにおいて、

前記共役脂肪酸が、グリセロールとエステル結合して共役脂肪酸グリセリドを形成していることを特徴とする共役脂肪酸エステル。

2. 有効成分としての共役二重結合を有する共役脂肪酸、好ましくは共役リノール酸を分子内に有する共役脂肪酸グリセリドと、医薬上許容される成分とを含む脂質代謝改善作用、抗肥満作用、又は高脂血症予防・治療作用を有する経口薬剤。

3. 脂質代謝改善、抗肥満、又は高脂血症予防及び／又は治療用に用いられる経口薬剤の製造のための、共役二重結合を有する共役脂肪酸を分子内に有する共役脂肪酸エステルの使用であって、

前記分子内の共役脂肪酸がグリセロールにエステル結合して共役脂肪酸グリセリドを形成していることを特徴とする共役脂肪酸グリセリドの使用。

4. 前記共役脂肪酸が、共役リノール酸であることを特徴とする請求項3に記載された共役脂肪酸エステルの使用。

5. 共役二重結合を有する共役脂肪酸を分子内に有する共役脂肪酸グリセリドと牛乳とを混合したことを特徴とする脂質代謝改善用牛乳。

6. 共役二重結合を有する共役脂肪酸を分子内に有する共役脂肪酸グリセリドと豆乳とを混合したことを特徴とする脂質代謝改善用豆乳。

7. カプセル基剤で成型されたカプセルと、該カプセル内に被包された共役脂肪酸グリセリドとを備え、

前記共役脂肪酸グリセリドは、共役二重結合を有する共役脂肪酸を分子内に有することを特徴とする脂質代謝改善用カプセル剤。

8. 共役二重結合を有する共役脂肪酸を分子内に有する共役脂肪酸グリセリドと、タブレット基材とを含むことを特徴とする脂質代謝改善用タブレット剤。

1 / 1

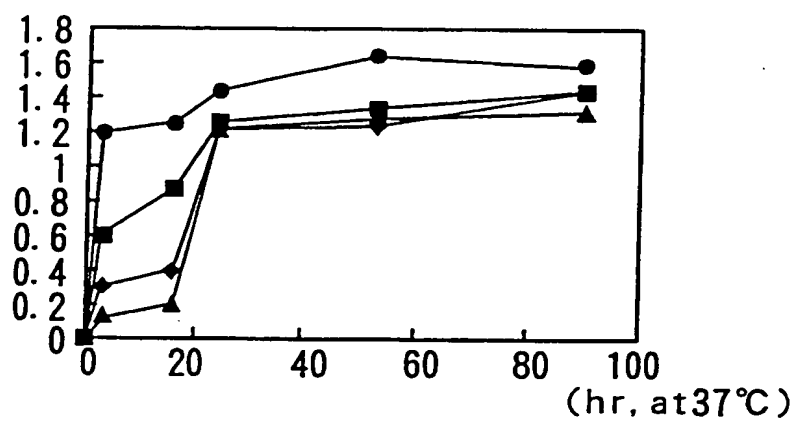


Fig. 1

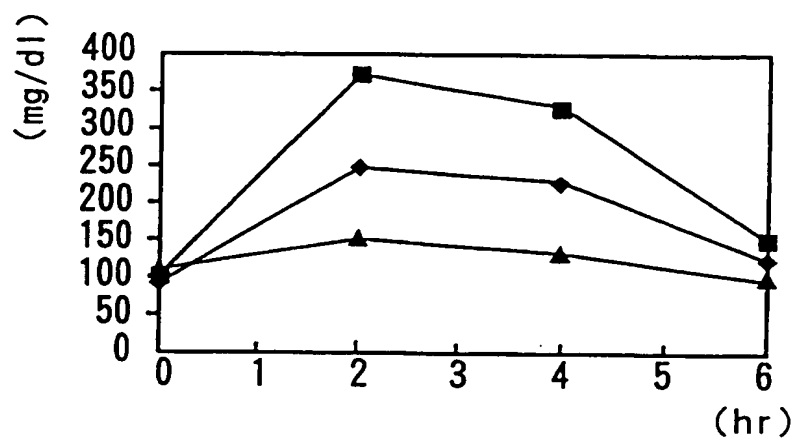


Fig. 2